AUS DEM INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE
UND VIROLOGIE DER UNIVERSITÄT DÜSSELDORF
Direktor: Prof. Dr. P. Naumann

Die Bedeutung von Rheumafaktoren für die IgM-Diagnostik der Syphilis

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

GABOR VLAZAK

1981

AUS DEM INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE

UND VIROLOGIE DER UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Direktor: Prof. Dr. P. Laumann

DIE BEDEUTUNG VON RHEUMAFAKTOREN FÜR DIE IgM-DIAGNOSTIK DER SYPHILIS

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eine Doktors

der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität

Düsseldorf

vorgelegt von

G Á B O R V L A Z A K

1 9 8 1

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez. Prof. Dr. Straßburg

Referent
gez. Prof. Dr. Naumann

Korreferent
gez. Prof. Dr. Görtz

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung

2. Methoden und Materialien

2.1. Seren

2.2. Isolierung von IgG

2.3. Anlagerung von aggregiertem IgG an suspendierte Polystyrol-Partikel

2.4. Isolierung von 19S IgM-Rheumafaktoren

2.5. Isolierung von Treponema-pallidum-spezifischen IgG-Antikörpern

2.6. Rheumafaktorteste

2.6.1. RAHA-Test

2.6.2. Latex-Objektträger-Agglutinationstest

2.7. IgM-FTA-Abs.-Test

2.8. IgM-19S-FTA-Abs.-Test

3. Ergebnisse

3.1. Häufigkeit von Rheumafaktoren bei Patienten mit nachgewiesener Syphilis im Vergleich zu einem Kollektiv von Blutspendern mit negativer Syphilis-Serologie

3.2. Falsch positive Ergebnisse im IgM-FTA-Abs.-Test durch 19S IgM-Rheumafaktoren

3.2.1. Theorie

3.2.2. Nachweis in einem Modellversuch

3.3. Möglichkeiten der Elimination von Rheumafaktor-bedingten unspezifischen Fluoreszenzeffekten

3.3.1. Methodik des Serumabsorption mit Latex-Absorbent

3.3.2. Prüfung des Absorptionsschrittes bezüglich einer eventuellen Reduktion von Serumbestand-teilen mit dem

3.3.2.1. Immundiffusionstest

3.3.2.2. IgM-FTA-Test

3.4. Ergebnisse der Prüfung des Absorptionsschrittes bei ausgewählten Humanseren

4. Schlußfolgerungen

5. Zusammenfassung

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536504_0112

1. Einleitung

Durch die Einführung der Technik der indirekten Immunfluoreszenz und der indirekten Hämagglutination hat die serologische Diagnostik der Syphilis eine entscheidende Änderung erfahren. (10, 22)

1976 stellte F. Müller ein neues Konzept für die Serodiagnostik der Syphilis vor. (16)

Nach seinen Vorschlägen ist die serologische Grunddiagnostik wie nachfolgend beschrieben durchzuführen.

a. Das zu untersuchende Patientenserum wird zunächst mit dem TPHA-Test (Treponema-pallidum-Hämagglutinations-Test) geprüft.

   Der TPHA-Test ist der Basistest zur Erfassung Treponema-pallidum-spezifischer Antikörper (Syphilis-Ausschlußuntersuchung).

   Zeigt dieser Test ein nicht reaktives (= negatives) Ergebnis, entfallen in der Regel weitere Untersuchungen. Bei schwach reaktivem (= zweifelhaftem) oder reaktivem (= positivem) Testergebnis werden zusätzlich

b. der FTA-Abs.-Test (Fluoreszenz-Treponema-pallidum-Antikörpertest) als Bestätigungsreaktion zur Sicherung der Diagnose und

c. der quantitative VDRL-Test (= Cardiolipin-Mikroflockungs-Test) als Parameter für die Beurteilung der Aktivität der Treponemeninfektion durchgeführt.

Sind der TPHA-Test und der FTA-Abs.-Test eindeutig reaktiv, gilt eine Syphilis als erwiesen.

Läßt sich mit dem VDRL-Test keine befriedigende Aussage über die Aktivität der Syphilis oder über den Therapieeffekt machen, steht heute eine zweite diagnostische Methode für den gleichen Zweck zur Verfügung: der Nachweis Treponema-pallidum-spezifischer Antikörper mit dem IgM-FTA-Abs.-Test.

Die diesem Test zugrunde liegende Theorie basiert auf folgender immunologischer Gegebenheit:

Im Verlauf einer Auseinandersetzung des Organismus mit Infektionserregern erscheinen im Patientenserum als Zeichen einer Immunantwort etwa 10 Tage post infectionem großmolekulare Antikörper vom Typ IgM. Erst in der Folgezeit produziert das Immunsystem erregerspezifische IgG-Antikörper. (4, 15)

Die Bildung von IgM-Antikörpern setzt die Persistenz des Antigens im Körper voraus, d.h. werden die Krankheitserreger aus dem Körper eliminiert, sistiert auch die Produktion der IgM-Antikörper; dagegen werden IgG-Antikörper über eine längere Zeitdauer vom Immunsystem weiter synthetisiert und z.T. wie bei der Syphilis lebenslang - auch nach ausgeheilter Erkrankung - im Serum gefunden. (1)

Aufbauend auf diese immunologischen Erkenntnisse entwickelten Müller und Loa 1974 (15) eine routinemäßig durchführbare Treponema-pallidum-spezifische IgM-Diagnostik, welche eine immunologische Früherkennung der Syphilis und eine Aussage über die Behandlungsbedürftigkeit der Patienten ermöglichen sollte.

Der Nachweis Treponema-pallidum-spezifischer IgM-Antikörper wurde in Anlehnung an die von Hunter, Deacon und Meyer (10) beschriebene Methode des FTA-Abs.-Testes ausgeführt und der Test als IgM-FTA-Abs.-Test bezeichnet. (15)

Große Bedeutung kommt dem Nachweis Erreger-spezifischer IgM-Antikörper zu

1. bei der Diagnose der Syphilis connata. Da großmolekulare IgM-Antikörper die Plazentarschranke nicht passieren, ist der Nachweis spezifischer IgM-Antikörper beim Neugeborenen ein sicherer Hinweis auf das Vorliegen einer konnatalen Infektion.

2. bei der Frühdiagnose der Primärsyphilis, insbesondere bei symptomlosem Verlauf der Erkrankung, bei Übersehen des Primäraffektes wegen atypischer Lokalisation, oder wenn der Treponemennachweis nicht gelingt. In diesem Zusammenhang soll darauf hingewiesen werden, daß die Anzahl symptomloser Fälle von Frühsyphilis (sog. maskierte Syphilis) seit Beginn der Antibiotika-Ära zugenommen hat. Die Häufigkeit wird mit 20 - 25 % der Fälle angegeben. (7)

3. bei der Erkennung unbehandelter Erkrankungsfälle in der Phase der Latenz und

4. bei dem Nachweis nicht ausreichend behandelter Patienten in allen Stadien der Infektion.

Bei der Frühsyphilis und im Stadium der Frühlatenz finden sich mit dem IgM-FTA-Abs.-Test regelmäßig Antikörper vom IgM-Typ.

Im Stadium der Spätlatenz und bei der diaplazentar übertragenen Infektion des Neugeborenen erweist sich der Test jedoch mit üblicher Methodik gelegentlich nur schwach oder gar nicht reaktiv.

Dieses Phänomen wurde als eine Blockierung der IgM-Bindung am Antigen durch hochtitrige IgG-Antikörper gedeutet (1, 10, 15, 17) und 1977 von F. Müller nachgewiesen (17); er fand bei 28,6 % der untersuchten Seren von Patienten im Stadium der Latenz bzw. Spätlatenz und Neurosyphilis eine kompetitive IgM-Hemmung.

Zur Reduktion der im Testsystem störenden IgG-Antikörper empfahl er die Gelfiltration der Seren über Sephadex G-200 mit anschließender Untersuchung des ersten Elutionsmaximums (19S-IgM-Antikörper) mit dem IgM-FTA-Abs.-Test. Er bezeichnete dieses Verfahren als IgM-FTA-19S-Test. (17)

Auf eine weitere potentielle Fehlerquelle bei der Durchführung des IgM-FTA-Abs.-Testes, nämlich auf das Vorkommen unspezifischer Fluoreszenzeffekte aufgrund einer immunologischen Reaktion von Treponemen-spezifischen 7S-IgG-Antikörpern und 19S-IgM-Rheumafaktoren, wird in der Literatur verschiedentlich hingewiesen. (23, 33)

Schon 1971 und 1973 zeigten Shirodaria, Fraser und Stanford, daß IgM-Rheumafaktoren bei dem Nachweis von Virus-spezifischen IgM-Antikörpern mit der Immunfluoreszenztechnik zu falsch positiven Testergebnissen führen können (6, 27); die gleiche Erscheinung beschrieben Yeni und Mitarbeiter 1978 (34) in Zusammenhang mit dem fluoreszenzoptischen Nachweis von Toxoplasma-IgM-Antikörpern.

In Hinblick auf die serologische Diagnostik der Syphilis machten 1975 Reimer und Mitarbeiter und 1976 Wilkinson und Rodin auf die Möglichkeit einer Fehlinterpretation des IgM-FTA-Abs.-Testes durch Rheumafaktor-bedingte unspezifische Fluoreszenzeffekte aufmerksam. (23, 33)

19S-IgM-Rheumafaktoren finden sich nicht nur bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, sondern bei verschiedenen chronischen Infektionskrankheiten, unter anderem auch bei der Syphilis.

Für die Induktion der Rheumafaktorbildung werden in Immunaggregaten gebundene 7S-IgG-Antikörper verantwortlich gemacht: homologe IgG-Antikörper und Antigene bilden Immunkomplexe. Durch diese Komplexbildung ändert sich die Struktur der IgG-Moleküle so, daß sie ihrerseits antigene Eigenschaften erhalten. Gegen diese veränderten IgG-Moleküle bildet der Organismus wiederum Antikörper. Diese Anti-IgG-Antikörper sind im wesentlichen Immunglobuline der IgM-Klasse. Sie werden als Rheumafaktoren bezeichnet. (32)

Da die Anzahl von abgelaufenen Immunreaktionen mit zunehmendem Lebensalter ansteigt, werden im Serum alter Menschen vermehrt Rheumafaktoren gefunden. (3)

Über die Häufigkeit des Vorkommens von Rheumafaktoren bei an Syphilis erkrankten Patienten schwanken die Angaben in der Literatur zwischen 10,3 und 12,4 %. (14, 18, 21)

Diese Werte wurden mit dem Waaler-Rose-Test und dem Latex-Fixationstest nach Singer und Plotz (29) gefunden.

Eine Korrelation zwischen dem Auftreten von Rheumafaktoren im Serum und Dauer der Syphiliserkrankung konnte aufgezeigt werden. (14)

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob 7S-IgG-19S-IgM-Rheumafaktor-Komplexe tatsächlich einen Fluoreszenzeffekt im IgM-FTA-Abs.-Test erzeugen und welche Relevanz diesem Phänomen für die Serodiagnose der Syphilis zukommt.

2. Materialien und Methoden

2.1. Seren: 835 Seren wurden teils unmittelbar nach Blutentnahme, teils nach Lagerung bei - 20° C untersucht.

Diese stammten von Patienten mit verschiedenen Stadien der Syphilis (n=335) und von Blutspendern mit negativer Syphilis-Serologie (n=500)

2.2. Isolierung von IgG durch Rivanol-Ammoniumsulfat-Präcipitation. (8)

Zu 1000 ml Pool-Serum wurden 690 ml Aqua dest. und ein Tropfen Iso-Oktan (Detergens) hinzugegeben.

Durch langsames Zusetzen von 650 ml einer 3%-igen Rivanollösung (pH 7,5) wurde zunächst das gesamte Albumin und fast die gesamte Menge der α - und β -Globuline aus dem verdünnten Serum als unlösliche Rivanol-Protein-Komplexe präcipitiert.

Die γ -Globuline werden durch Rivanol weder denaturiert noch in ihrer biologischen Aktivität beeinträchtigt. (9, 30)

Um das nicht verbrauchte Rivanol aus der Lösung zu entfernen, wurde der Überstand mit 11,7 g NaCl versetzt und anschließend filtriert. Dem Filtrat wurde sodann ein gleiches Volumen gesättigte Ammoniumsulfatlösung sehr langsam, tropfenweise und unter ständigem Rühren (Magnetrührer) hinzugefügt, um das IgG bei 50%-iger Ammoniumsulfatsättigung auszufällen.

Nach Beendigung dieses Vorganges wurde dekantiert, zentrifugiert und das Präcipitat in 500 ml Aqua dest. gelöst. Sodann erfolgte eine nochmalige Fällung des IgG mit 500 ml Ammoniumsulfatlösung (50%-ig) und ein anschließendes Waschen des Präcipitates.

Zum Schluß wurde das in Aqua dest. gelöste IgG gegen eine 0,85%-ige NaCl-Lösung dialysiert, bis die Spüllösung frei von Sulfationen war.

Das auf diese Weise gewonnene IgG enthält abgesehen von immunelektrophoretisch nachweisbaren Spuren α_2HS-Globulin keine anderen Verunreinigungen. (8)

2.3. Anlagerung von aggregiertem IgG an suspendierte Polystrol-Partikel (Latex). (26)

Durch Rivanol-Ammoniumsulfat-Fällung gewonnenes IgG (Proteinkonzentration: 30 mg/ml, Biuret-Bestimmung (25)) wurde 10 Minuten bei 63° C erhitzt, wobei sich durch die Wärmeeinwirkung IgG-Aggregate bildeten. (19)

In einem Vorversuch wurde diejenige Proteinkonzentration ermittelt, bei welcher sich alle Latex-Partikel (Latex 0.81 BACTO, Difco Laboratories) optimal mit IgG beladen.

Zu diesem Zweck wurde eine Verdünnungsreihe der IgG-Stammlösung mit 0,01 M Tris-Puffer (pH 7,2) hergestellt. Die einzelnen IgG-Verdünnungen wurden mit einem gleichen Volumen einer Latexsuspension versetzt (Latex-Konzentrat 1:15 mit physiologischer NaCl verdünnt).

Dann wurde das Latex-IgG-Gemisch 30 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert und während dieser Zeit drei mal vorsichtig aufgeschüttelt. Im Anschluß erfolgte eine zweimalige Waschung mit 0,01 M Tris-Puffer (pH 7,2) welches 200 mg Polyvinylpyrrolidon (PVP)/l enthielt.

Die nun beladenen Latex-Partikel wurden in Puffer resuspendiert und über Nacht bei 4° C stehengelassen. War eine Beladung eingetreten, sedimentieren die Polystyrol-Partikel aus, unbeladene blieben in Suspension.

Eine optimale Proteinkonzentration lag vor, wenn das IgG 1:500 mit Puffer verdünnt war.

Für die Produktion von IgG-beladenem Latex wurden gleiche Volumina der o.e. Proteinverdünnung und der Latexsuspension (1:15 in physiologischer NaCl) miteinander gemischt und genauso behandelt wie im Vorversuch.

Zentrifugiert wurde immer bei 10° C.

Die gewaschenen Latexpartikel wurden in 0,01 M Tris-Puffer, der 0,1 % Natriumazid enthielt, aufgenommen und bei 4° C gelagert.

2.4. Isolierung von 19S-IgM-Rheumafaktor

Material: Hyland LAS-R Rheumatoid Factor Control Serum Level II

Zunächst wurde das Serum mit dem TPHA- und dem FTA-Abs.-Test geprüft. Es konnten keine Trep. pallidum-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden.

24,0 ml des oben genannten Serums wurden auf 6,0 ml konzentriert, auf eine Ultrogel AcA 34-Säule aufgetragen und mit Tris-Puffer (pH 7,4) durch das Gelbett filtriert.

Auf eine Gelfiltration bei saurem pH wurde verzichtet, um eine Denaturierung des IgM-Rheumafaktors (IgM-RF) zu vermeiden.

Daten der Säule: Gelbett: 2,6 x 100,0 cm, lineare Durchflußgeschwindigkeit während der Trennung 6,6 cm/h.

Die Fraktionen des ersten Elutionsmaximums wurden immunelektrophoretisch und mit dem Latex-Objektträger-Agglutinationstest (Latex-RF-Test) geprüft. Fraktionen, welche RF-Aktivitäten aufwiesen und nicht mit IgG oder Albumin verunreinigt waren, wurden gepoolt, gegen physiol. NaCl dialysiert und anschließend auf 4,0 ml konzentriert.

2.5. Isolierung von Treponema pallidum-spezifischen IgG-Antikörpern

Aus 4 Plasmakonserven, welche Treponema pallidum-spezifische Antikörper (AK) aufwiesen, wurde mit der Rivanol-Ammoniumsulfat-Methode die IgG-Fraktion isoliert.

Jeweils 10 ml der konzentrierten IgG-Lösung wurden nochmals durch Gelfiltration gereinigt. (Ultrogel AcA 34, Gelbett: 5,0 x 100 cm). Die einzelnen Fraktionen wurden immunelektrophoretisch und im FTA-Abs.-Test geprüft.

Die im FTA-Abs.-Test positiv reagierenden und von Verunreinigungen freien IgG-Fraktionen wurden gepoolt und solange konzentriert, bis die IgG-AK im TPHA- und FTA-Abs.-Test folgende Titer aufwiesen:

TPHA-Titer: 1:1280

IgG-Titer im FTA-Abs.-Test: 1:640

2.6. Rheumafaktorteste

2.6.1. Rheumafaktor-Hämagglutinationstest (RAHA-Test)

Der RAHA-Test ist ein Hämagglutinationstest zum Nachweis des Rheumafaktors, unter Verwendung von Schaferythrocyten, die mit Kaninchen γ-Globulin (IgG) sensibilisiert sind. (MAST Diagnostika)

Der Arbeitsgang erfolgte nach den Durchführungsvorschriften des Herstellers; es wurde die Mikrohämagglutinationsmethode angewendet.

Nach Inaktivierung der zu testenden Seren bei 56° C für 30 Minuten wurden diese in einer Mikrotiterplatte in Zweierstufen von 1:40 bis 1:10240 verdünnt. Die Serumverdünnungen wurden 30 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert, danach mit sensibilisierten Zellen versetzt und die Platten über Nacht erschütterungsfrei stehengelassen.

Eine negative Kontrolle erfolgte mit nicht sensibilisierten Zellen bei einer Serumverdünnung von 1:40. Ein der Testpackung beigefügtes Reaktivserum diente als positive Kontrolle.

2.6.2. Latex-RF-Test (Behringwerke AG)

Latex-RF-Reagenz besteht aus einer wässrigen Suspension von Polystyrol-Partikeln, die mit Human- γ-Globulin beladen sind.

Der Test wurde nach den Anweisungen des Herstellers ausgeführt. (Objektträger-Agglutinationstest)

Patientenserum wurde mit Glycin-NaCl-Puffer 1:20 und abweichend von der Originalvorschrift auch 1:10 verdünnt.

Ein Tropfen dieser Verdünnung wurde mit einem Tropfen Latex-RF-Reagenz auf einem Objektträger gut gemischt und der Objektträger rotierend bewegt.

2.7. IgM-FTA-Abs.-Test

Materialien:
- Treponemensuspension (Nicholsstamm) Firma BAG
- FITC-markiertes Anti-Human-IgM (bio Merieux)
- Bacto FTA-Sorbent (DIFCO Laboratories)

Die Treponemensuspension wurde auf Objektträger aufgetragen, luftgetrocknet und mit Aceton fixiert.

Die Seren wurden parallel 1:5 mit Phosphatpuffer (PBS) pH 7,2 und FTA-Sorbent verdünnt, anschließend 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehengelassen und jeweils 10 µl dieser Verdünnungen auf die Objektträger aufgetragen. Danach wurde das Antigen 45 Minuten mit den verdünnten Seren (feuchte Kammer) inkubiert, die Objektträger 10 Minuten mit PBS pH 7,2 gespült und diese anschließend mit Filterpapier vorsichtig abgetupft.

Nach Überschichtung der Präparate mit jeweils 10 µl FITC-markiertem Anti-Human-Serum (Anti-IgM) wurden die Objektträger erneut bei 37 °C 45 Minuten inkubiert. Sodann wurde wiederum 10 Minuten mit PBS und anschließend 5 Minuten mit Aqua dest. gespült.

Der Fluoreszenzeffekt wurde im Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskop beurteilt.

Bewertung der Fluoreszenzeffekte:

F-Werte:	0, +/-	:	nicht reaktiv
	+, +/++	:	schwach reaktiv
	++, +++, ++++	:	reaktiv

2.8. IgM-19S-FTA-Abs.-Test

1,0 ml Serum wurde mit Tris-Puffer pH 7,4 durch ein Gelbett filtriert (Ultrogel AcA 34, LKB Schweden; Gelbett: 2,6 x 70 cm).

Die Fraktionen des ersten Elutionsmaximums wurden mit dem IgM-FTA-Abs.-Test auf das Vorhandensein von IgM-Antikörpern geprüft.

Bei reaktivem Testergebnis wurden die Fraktionen 10-fach konzentriert und der Fluoreszenzeffekt nach Absorption mit FTA-Sorbent bzw. Verdünnung mit PBS (pH 7,2) nochmals beurteilt. Technik: wie unter 2.7. beschrieben.

3. ERGEBNISSE

3.1. Häufigkeit von Rheumafaktoren bei Patienten mit nachgewiesener Syphilis im Vergleich zu einem Kollektiv von Blutspendern mit negativer Syphilis-Serologie.

In einem Vorversuch wurde zunächst geprüft, ob der Latex-Tropfen-Test nach Rheins (24) eine hinreichende Empfindlichkeit für die zu untersuchende Fragestellung besitzt.

Zu diesem Zweck wurden 100 Seren von Patienten mit serologisch gesicherter Syphilis vergleichend mit dem Latex-Tropfen-Test und einem Rheumafaktor-Hämagglutinationstest, dem RAHA-Test untersucht. In der Tabelle 1 sind die mit den beiden Testsystemen gefundenen Ergebnisse dargestellt.

Tabelle 1 Vergleich des Latex-Tropfen-Testes mit dem RAHA-Test bei 100 Seren von Patienten mit serologisch gesicherter Syphilis

RF-Teste	TESTERGEBNISSE	
	positiv	negativ
Latex-Tropfen-Test	4	96
RAHA-Test	15	85

Mit dem RAHA-Test konnte in fünfzehn Seren der Rheumafaktor (RF) nachgewiesen werden, mit dem Latex-Test dagegen nur in vier Seren. Die vier im Latex-Test positiven Proben reagierten auch im RAHA-Test.

Die Spezifität des Reaktionsausfalls wurde durch Absorption der Seren mit aggregiertem IgG (Latex-Absorbent) überprüft. Nach erfolgter Serumabsorption zeigte der RAHA-Test in allen Fällen ein negatives Ergebnis.

Ein Vergleich der mit den beiden Methoden ermittelten RF-Titer ergab, daß der Latex-Tropfen-Test in der Regel erst dann positiv reagierte, wenn ein RAHA-Titer $\geq$ 1 : 320 vorlag.

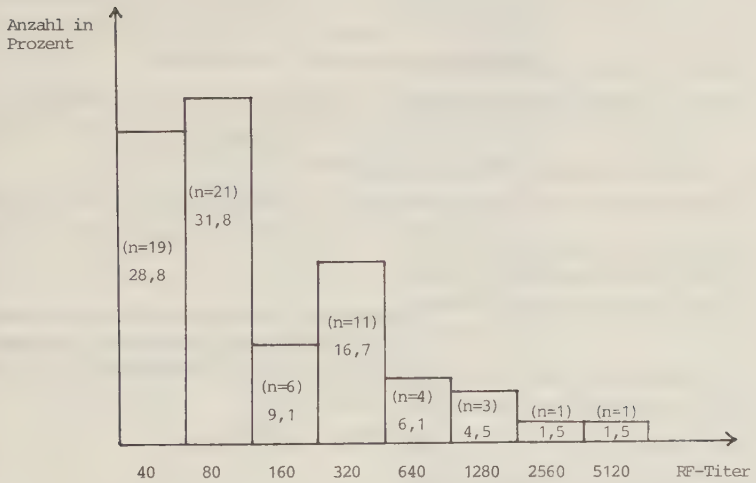
Auf Grund der höheren Empfindlichkeit des Hämagglutinationstestes wurden alle weiteren Untersuchungen mit dem RAHA-Test durchgeführt.

Insgesamt wurden 335 Seren von Patienten mit einer frischen oder bereits durchgemachten Treponema pallidum-Infektion mit dem RAHA-Test untersucht. Bei 17,5 % der Patientenseren waren Rheumafaktoren nachweisbar.

Im Vergleich hierzu fanden sich Rheumafaktoren mit dem selben Testsystem bei einem Kollektiv von 500 Blutspendern mit negativer Syphilis-Serologie nur in 7,8 % der Fälle.

Die Abbildung 1 informiert über die Häufigkeit der verschiedenen Titerhöhen des RAHA-Testes bei den 66 RF-positiven Seren von Syphilis-Patienten. Wie aus dieser Abbildung zu ersehen ist, hatten 69,7 % der Proben einen RAHA-Titer $<$ 1:320 und wären daher mit dem Latex-Test nicht erfaßt worden.

Abb. 1 Häufigkeit der verschiedenen Titerhöhen des RAHA-Testes bei 66 RF-positiven Seren von Patienten mit serologisch gesicherter Syphilis



3.2. Falsch positive Ergebnisse im IgM-FTA-Abs.-Test durch 19S IgM-Rheumafaktoren.

3.2.1. Theorie

Unter dem Begriff "Rheumafaktor" wird eine Gruppe von Antikörpern subsumiert, welche mit γ -Globulinen verschiedener Herkunft reagieren können. Rheumafaktoraktivitäten sind vorwiegend in der 19S IgM-Fraktion der Serumglobuline zu finden.

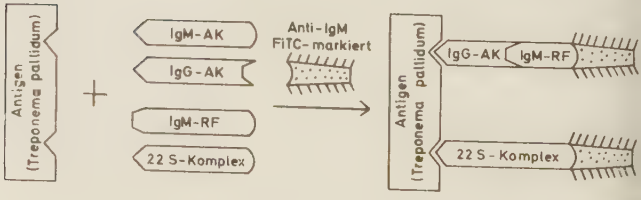
Als Antigen reagieren 19S IgM-Rheumafaktoren (19S IgM-RF) wie normales IgM, unterscheiden sich von diesen lediglich durch ihre Reaktionsfähigkeit mit γ -Globulinen.

Im Blut zirkulieren 19S IgM-RF wahrscheinlich großteils als 22S-Komplexe, welche durch eine immunologische Reaktion mit körpereigenem 7S IgG entstehen. (12, 13, 28)

Die Theorie der Erzeugung von Rheumafaktor-bedingten unspezifischen Fluoreszenzeffekten kann folgendermaßen schematisch veranschaulicht werden:

Abb. 2 Unspezifischer Fluoreszenzeffekt im IgM-FTA-Abs.-Test durch die immunologische Reaktion von Treponema pallidum-spezifischen 7S IgG-Antikörpern und 19S IgM-RF am Antigen.

Schematische Darstellung



Treponema pallidum-spezifische IgG-Antikörper werden an das Antigen gebunden. Sind in dem zu untersuchenden Serum zusätzlich IgM-RF vorhanden, reagieren diese auf Grund ihrer Antikörpereigenschaft mit den gebundenen IgG-Molekülen.

Ein anderer Mechanismus, der zu diskutieren ist besteht darin, daß die im Serum vorliegenden 22S Komplexe, bestehend aus spezifischen IgG-Antikörpern und IgM-RF, an die Treponemen fixiert werden.

Nach Reaktion mit dem FITC-markierten Anti-Human-IgM-Serum entsteht eine unspezifische Fluoreszenz.

3.2.2. Nachweis der Rheumafaktor-bedingten unspezifischen Fluoreszenz in einem Versuchsmodell

Um die unspezifischen Fluoreszenzeffekte im IgM-FTA-Abs.-Test nachzuweisen, wurden zunächst fünf Seren ausgewählt, die im TPHA-Test negative Reaktionen zeigten.

Eines dieser Seren hatte einen RF-Titer (RAHA-Test) von 1:1280, die vier anderen Seren waren RF-negativ.

Allen fünf Seren wurden gleiche Mengen Treponema pallidum-spezifische IgG-Antikörper und 19S IgM-RF zugesetzt und das Auftreten eines Fluoreszenzeffektes vor und nach Absorption mit aggregiertem IgG (Latex-Absorbent) im IgM-FTA-Test untersucht. Hierbei wurde zur Verbesserung der Empfindlichkeit auf die Durchführung des Absorptionsschrittes mit FTA-Sorbent verzichtet. Ein durch Verunreinigung der Einzelsubstanzen mit Trep.pall.-spezifischen IgM-Antikörper bedingter Fluoreszenzeffekt wurde ausgeschlossen.

Bei allen fünf Seren war nach Zugabe von spezifischen IgG-Antikörpern und IgM-RF die unspezifische Fluoreszenz nachweisbar. Dieser war sicher Rheumafaktor-bedingt, weil sie nach Absorption der Seren mit aggregiertem IgG nicht mehr zu beobachten war.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in der Tabelle 2 dargestellt.

Der Abfall des RF-Titers bei Serum Nr. 5 nach IgG-Zugabe ist erstens als Verdünnungseffekt und zweitens als eine Absättigung der Valenzen der IgM-RF-Moleküle durch immunologische Reaktion mit IgG-Antikörpern zu werten. Die unterschiedlichen Fluoreszenzeffekte der Seren bei jeweils gleichem Gehalt an Trep.pall.-spezifischem IgG und 19S IgM-RF könnten durch eine unterschiedliche Gesamt-IgG-Konzentration der Seren erklärt werden. (Je höher die Gesamt-IgG-Konzentration, desto weniger IgM-RF bleibt für die Interaktion mit Trep.pall.-spezifischen IgG-Antikörpern übrig.)

Tabelle 2 Versuchsmodell zum Nachweis der Rheumafaktor-bedingten unspezifischen Fluoreszenz.

Testergebnisse vor und nach Absorption mit Latex-Absorbent

Seren	vor Absorption: RF-Titer (RAHA-Test)			vor Absorption: Fluoreszenzeffekt im IgM-FTA-Test				nach Absorption: RF-Titer (RAHA-Test)	nach Absorption: Fluoreszenzeffekt im IgM-FTA-Test
	Serum	Serum + IgG	Serum + IgG +IgM-RF	Serum	Serum + IgG	Serum + IgM-RF	Serum + IgG + IgM-RF	Serum + IgG + IgM-RF	Serum + IgG + IgM-RF
1	--	--	1:40	--	--	--	++	--	--
2	--	--	1:40	--	--	--	+	--	--
3	--	--	1:40	--	--	--	+	--	--
4	--	--	1:40	--	--	--	+	--	--
5	1:1280	1:320	1:640	--	++/+++	--	+++	--	--

Die Ergebnisse dieses Versuches bestätigen die oben dargestellte Theorie über die Entstehung von unspezifischen Fluoreszenzeffekten im IgM-FTA-Abs.-Test.

In einem weiteren Versuch sollte nun die Abhängigkeit der Fluoreszenzstärke von verschiedenen IgM-RF- und spezifischen IgG-Antikörper-Konzentrationen festgestellt werden.

Zunächst wurde der RF-Titer des gereinigten IgM-RF und der IgG- sowie TPHA-Titer des Trep.pall.-spezifischen IgG-Antikörpers mit dem FTA-Abs.- bzw. mit dem TPHA-Test ermittelt.

Hiernach wurde der IgM-RF von 1:5 bis 1:640 und der spezifische IgG-Antikörper von 1:2 bis 1:64 verdünnt (jeweils Faktor 2). Der erste Verdünnungsschritt erfolgte bei beiden Verdünnungsreihen mit FTA-Sorbent; dann wurde mit PBS (pH 7,2) weiterverdünnt.

Nachdem gleiche Volumina von Verdünnungen des IgG-Antikörpers und IgM-RF miteinander gemischt, gut geschüttelt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert worden waren, erfolgte die Beurteilung der Fluoreszenzeffekte im IgM-FTA-Abs.-Test.

Die Intensität der Fluoreszenz wurde mit 0, 1+, 2+, 3+, 4+ (F-Werte) beurteilt.

Dieser Modellversuch - dargestellt in Tabelle 3 - ergab, daß bei hohen Trep.pall.-spezifischen IgG-Konzentrationen schon geringe Quantitäten von IgM-RF genügen, um falsch positive IgM-Fluoreszenzen zu erzeugen. Andererseits führen selbst hohe Konzentrationen des IgM-RF kaum zu einer unspezifischen Fluoreszenz, wenn der Gehalt spezifischer IgG-Antikörper niedrig ist.

Diese Ergebnisse haben für die Aussagekraft der treponemenspezifischen IgM-Diagnostik wichtige Folgen:

Bei Patienten mit ausreichend behandelter Syphilis, sind erregerspezifische IgM-Antikörper ein bis zwei Jahre nach Abschluß der Behandlung nicht mehr nachweisbar, während Treponemen-spezifische IgG-Antikörper zum Teil lebenslang im Serum persistieren (sogenannte Serum-Narbe). Wenn in solchen Fällen zusätzlich Rheumafaktoren vorhanden sind, können sich Immunkomplexe aus Treponemen-spezifischen IgG-Antikörpern und IgM-Rheumafaktoren bilden, die einen falsch positiven Reaktionsausfall des IgM-FTA-Abs.-Testes verursachen. Hierbei ist, wie zuvor gezeigt, sowohl die Konzentration der IgG-Antikörper als auch der Rheumafaktoren von Bedeutung.

Tabelle 3 Fluoreszenzeffekte im IgM-FTA-Abs.-Test (F-Werte) durch IgM-RF-IgG-AK-Immunkomplexe in Abhängigkeit von der Konzentration der beiden Globuline

	Titer des IgM-RF (RAHA-Test)							
Titer des IgG-AK	1:640	1:320	1:160	1:80	1:40	1:20	1:10	1:5
(FTA-Abs.-Test)	FLUORESZENZEFFEKT IM IgM-FTA-TEST							
1:320	4+	4+	3+	3+	2+	1+	1+	0
1:160	4+	4+	3+	3+	2+	1+	0	0
1:80	3+	3+	3+	2+	1+	1+	0	0
1:40	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0
1:20	2+	1+	1+	0	0	0	0	0
1:10	1+	0	0	0	0	0	0	0
1:5	0	0	0	0	0	0	0	0

3.3. Möglichkeiten der Elimination von Rheumafaktor-bedingten unspezifischen Fluoreszenzeffekten

Da laut Definition Rheumafaktoren Anti-Gammaglobulinfaktoren sind, die mit reaktionsfähigem 7S IgG in eine immunologische Reaktion zu treten vermögen, besteht die Möglichkeit, Rheumafaktoren auf Grund dieser Immunreaktion aus dem Serum zu entfernen.

Zu diesem Zweck bieten sich folgende alternative Methoden an:

a. Präparation von unlöslichem IgG durch Glutaraldehydbehandlung und anschließender Verwendung dieser Substanz als Immunoabsorbent. (2)

b. Anlagerung von IgG an formalinfixierte und tanninisierte Schaferythrocyten. (20)

c. Beladung von Polystyrol-Partikeln mit IgG. (26)

Die Anlagerung von Globulinen an Polystyrol-Partikel (Latex) ist eine relativ einfache und schnell durchführbare Technik. Aus diesem Grunde wurde diese Methode ausgewählt.

Weil die Bindungsaffinität von aggregiertem IgG gegenüber Rheumafaktoren höher ist, als diejenige von nativem 7S IgG (5) fand hitzeaggregiertes IgG zur Herstellung des Absorbents Verwendung.

3.3.1. Methodik der Serumabsorption mit Latex-Absorbent

Die Anlagerung des aggregierten IgG an die Latex-Partikel erfolgte wie unter 2.3. beschrieben. Das fertige Produkt wurde als "Latex-Absorbent" bezeichnet.

Das Volumen an 0,01 M Tris-Puffer, in welchem das Absorbent für die Aufbewahrung resuspendiert wurde, war so bemessen, daß zum Schluß eine 5%-ige Suspension vorlag. Diese wurde in 2ml-Portionen aufgeteilt und bei 4 °C aufbewahrt. Bei Bedarf wurde diese Suspension 10 Minuten zentrifugiert, 1,5 ml des Überstandes abgehebert und die Latex-Partikel in dem verbliebenen Puffer vorsichtig resuspendiert (20%-ige Suspension).

Zur Absorption wurde 80 µl Serum mit 100 µl 20%-iger Latex-Suspension versetzt (resultierende Serumverdünnung: 1:2), das Gemisch kurz aufgeschüttelt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde nochmals vorsichtig geschüttelt und dann das Serum-Latex-Gemisch über Nacht bei 4 °C stehengelassen.

Nach 10-minütigem Zentrifugieren (Eppendorf-Zentrifuge) wurde der Überstand vorsichtig abgehebert und anschließend untersucht.

Bei 66 Rheumafaktor-positiven Seren von Patienten mit serologisch gesicherter Syphilis wurde die Absorption mit Latex-Absorbent nach der oben beschriebenen Methodik durchgeführt. Der RF-Titer wurde vor und nach der Absorption mit dem RAHA-Test bestimmt.

Es hat sich hierbei gezeigt, daß Rheumafaktor-Konzentrationen entsprechend einem RAHA-Titer von $\leq$ 1:1280 sicher absorbiert werden konnten, während bei höherem Rheumafaktor-Gehalt des Serums der Absorptionsschritt nicht effektiv war.

Da jedoch bei 97 % der untersuchten Seren ein RF-Titer ≤ 1:1280 (RAHA) gefunden wurde, kann davon ausgegangen werden, daß die Rheumafaktoren in der Regel ausreichend absorbiert werden (siehe Abb. 1).

Bei Seren mit einem RAHA-Titer > 1:1280 muß die Menge des Absorptionsmittels erhöht werden. Hierbei empfiehlt es sich, zur Absorption z.B. eine 40%-ige Latex-Suspension zu verwenden. (Verdünnungseffekt!)

3.3.2. Prüfung des Absorptionsschrittes bezüglich einer eventuellen Reduktion von Serumbestandteilen

Nachdem das an Latex-Partikel gebundene aggregierte IgG (Latex-Absorbent) sich als geeignet erwiesen hatte, Rheumafaktoren aus dem Serum zu eliminieren, wurde in einem weiteren Versuch geprüft, ob durch den Absorptionsschritt eine Reduktion von Albumin, IgG und insbesondere der Globuline der IgM-Klasse erfolgte. Zu diesem Zweck wurden RF-negative Human-Seren mit Latex-Absorbent absorbiert und anschließend mit dem Immundiffusionstest und dem IgM-FTA-Abs.-Test untersucht.

3.3.2.1. Immundiffusionstest

Ein Teil des zu untersuchenden Serums wurde nach Vorschrift mit Latex-Absorbent absorbiert. Parallel hierzu wurde ein zweiter Teil desselben Serums mit 0,9%-iger NaCl 1:2 verdünnt, um den durch den Absorptionsschritt bedingten Verdünnungseffekt in der ersten Probe auszugleichen. Nach Auftragen der Proben auf Tri-Partigen-Platten (Behring) wurde die Konzentration von Albumin, IgG und IgM nach den Anweisungen des Herstellers bestimmt.

Tabelle 4 Einfluß der Absorption mit Latex-Absorbent auf die Konzentration von Albumin, IgG und IgM in Rheumafaktor-negativen Seren.

	Protein in mg/1oo ml Serum Mittelwerte aus Mehrfachbestimmungen (n=5)	
	vor Absorption mit Latex-Absorbent	nach Absorption mit Latex-Absorbent
IgM	11o	11o
IgG	163o	1612
Albumin	4583	423o

Die in Tabelle 4 dargestellten Werte zeigen, daß durch den Absorptionsschritt die Konzentrationen von IgG und IgM nicht vermindert wurden. Lediglich ein leichter Abfall der Albumin-Konzentration konnte beobachtet werden. Dies könnte methodisch bedingt sein, da die Genauigkeit der Albuminbestimmung nicht so groß ist wie diejenige der IgG- oder IgM-Bestimmung.

3.3.2.2. Fluoreszenztest

Um eine im Immundiffusionstest nicht erfassbare Reduktion Trep.pall.-spezifischer IgM-Antikörper auszuschließen, wurde der Absorptionsschritt zusätzlich auch mit dem IgM-FTA-Test überprüft.

Aus der Tabelle 5 ist zu ersehen, daß die Absorption der Seren mit Latex-Absorbent keinen Einfluß auf den Reaktionsausfall des IgM-FTA-Testes hatte. Vor und nach Absorption der IgM-Fraktion (verdünnt mit PBS, pH 7,2 und Humanserum) blieb der IgM-Titer konstant.

Tabelle 5 Einfluß der Absorption mit Latex-Absorbent auf den Reaktionsausfall des IgM-FTA-Testes in Rheumafaktor-negativen Proben

	FLUORESZENZEFFEKT IM IgM-FTA-TEST							
Absorption mit Latex-Absorbent	IgM-Antikörper-Verdünnungen							Verdünnungsmedium
	konz.	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	
vor Abs.	3+	2+	2+	1+	1+	1+	+/-	gereinigte IgM-Fraktion in PBS
nach Abs.	3+	2+	2+	1+	1+	+/-	+/-	
vor Abs.	3+	2+	2+	2+	1+	+/-	+/-	gereinigte IgM-Fraktion in Humanserum
nach Abs.	3+	2+	2+	1+	1+	+/-	+/-	

3.4. Ergebnisse der Prüfung des Absorptionsschrittes bei ausgewählten Humanseren

Mit dem unter 3.3.1. dargestellten Absorptionsverfahren wurden 55 Seren von Patienten mit Trep.pallidum-Infektion untersucht.

Bei 29 dieser Seren waren Rheumafaktoren nachweisbar. Von diesen zeigten 23 (= 79,3 %) im IgM-FTA-Abs.-Test ein reaktives oder schwach reaktives Ergebnis. Nach Absorption der Seren mit Latex-Absorbent verminderte sich die Anzahl dieser Befunde von 23 (= 79,3 %) auf 11 (= 37,9 %) (siehe Tabelle 6).

Bei den 26 RAHA-negativen Seren war der IgM-FTA-Abs.-Test vor der Absorption mit Latex-Absorbent in 13 Fällen reaktiv oder schwach reaktiv. Durch die Serumabsorption wurde die Zahl der reaktiven oder schwach reaktiven Proben von 13 (= 50 %) auf 10 (= 38,5 %) reduziert (siehe Tabelle 6).

Die dargestellten Ergebnisse verdeutlichen, daß einerseits bei positivem Ausfall des RAHA-Testes relativ häufig falsch positive IgM-FTA-Abs.-Resultate nachweisbar sind, andererseits aber auch bei negativem Ausfall des RAHA-Testes falsch positive Ergebnisse nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden können.

Schwierig zu interpretieren sind grundsätzlich schwach reaktive Testergebnisse im IgM-FTA-Abs.-Test. In einem Teil solcher Fälle konnte nachgewiesen werden, daß es sich um den Einfluß von Rheumafaktoren handelte.

Von elf schwach reaktiven IgM-Befunden wurden sieben durch die Absorption negativ. In vier Fällen konnte der Reaktionsausfall nicht beeinflußt werden (siehe Tabelle 7).

Von den zwölf im RAHA-Test positiven und im IgM-FTA-Abs.-Test eindeutig reaktiven Seren wurde nach Durchführung des Absorptionsschrittes bei fünf Seren ein negatives Ergebnis gefunden, während vier einen schwach reaktiven Befund zeigten (siehe Tabelle 7).

Bei diesen Seren, die nach der Absorption noch ein schwach reaktives Ergebnis zeigten, ergibt sich zwangsläufig die Frage, ob der Absorptionsschritt nicht effizient war, oder ob es sich tatsächlich um eine spezifische Fluoreszenz handelte. Für die Spezifität des Reaktionsausfalls spricht, daß die Ergebnisse des IgM-FTA-Abs.-Testes in Kombination mit der Latex-Absorption in der Regel nach Fraktionierung der Seren im 19S IgM-FTA-Abs.-Test bestätigt werden konnten. Die Tabelle 8 veranschaulicht dies an einigen ausgewählten Beispielen.

Tabelle 6 Reaktionsausfall des IgM-FTA-Abs.-Testes vor und nach Absorption von Humanseren mit Latex-Absorbent

	S E R E N (n=55)					
Absorption mit Latex-Absorbent	RAHA-Test positiv (n=29)			RAHA-Test negativ (n=26)		
	nicht reaktiv	schwach reaktiv	reaktiv	nicht reaktiv	schwach reaktiv	reaktiv
vor Abs.	6 (20,7%)	11 (38,0%)	12 (41,3%)	13 (50,0%)	8 (30,8%)	5 (19,2%)
nach Abs.	18 (62,1%)	8 (27,6%)	3 (10,3%)	16 (61,5%)	6 (23,1%)	4 (15,4%)

Tabelle 7 Ergebnisse des IgM-FTA-Abs.-Testes vor und nach Serumabsorption mit Latex-Absorbent bei RF-positiven Seren. (Erweiterung der Tabelle 6)

Ergebnisse des IgM-FTA-Abs.-Testes			
vor Abs. mit Latex-Absorbent	nach Abs. mit Latex-Absorbent		
	reaktiv	schwach reaktiv	nicht reaktiv
reaktiv (n=12)	3	4	5
schwach reaktiv (n=11)	0	4	7
nicht reaktiv (n=6)	0	0	6
n 29	3	8	18

Tabelle 8 Reaktionsausfall des IgM-FTA-Abs.-Testes vor und nach Serumabsorption mit Latex-Absorbent, sowie Ergebnisse des parallel durchgeführten 19S IgM-FTA-Abs.-Testes

Ausgewählte Beispiele

	FLUORESZENZEFFEKTE			
Serum-Nr.	IgM-FTA-Abs.-Test Absorption mit Latex-Absorbent		19S IgM-FTA-Abs.-Test	RF-Titer (RAHA-Test)
	vor Abs.	nach Abs.		
1	++/+++	+/++	+	1:80
2	++	+/++	+/++	1:40
3	++	+	+	1:40
4	++	--	--	1:160
5	+/++	+/++	+/++	1:80
6	+/++	--	--	1:320
7	++	+/++	+	--
8	+/++	--	--	--
9	+/++	+/++	+/++	--

-- , +/- : nicht reaktiv
+ , +/++: schwach reaktiv
++ , +++, ++++: reaktiv

Auch auf Grund der klinischen Befunde bzw. der Infektions- und Behandlungsanamnese sind die Untersuchungsergebnisse bei den acht Patienten mit schwach reaktivem Ergebnis des IgM-FTA-Abs.-Testes plausibel, da es sich um kurz zuvor behandelte Infektionen sowie um Patienten mit aktiver Syphilis (Stadium 2) oder aber um Erkrankungen im Latenzstadium handelte.

Bei den drei RF-positiven Seren, deren eindeutig reaktives Testergebnis im IgM-FTA-Abs.-Test durch die Absorption mit dem Latex-Absorbent nicht beeinflußt wurde (siehe Tabelle 6) handelte es sich im einzelnen um folgende Fälle:

a. Klinisch nachgewiesene Frühsyphilis mit gleichzeitig hohem VDRL-Titer.

b. Syphilis drei Monate zuvor diagnostiziert und frühzeitig behandelt.

c. In dem dritten Fall waren klinische Angaben nicht eruierbar, laut Ergebnissen anderer serodiagnostischer Tests, unter anderem auch des 19S IgM-FTA-Abs.-Testes, lag eine wahrscheinlich behandlungsbedürftige syphilitische Infektion vor.

Abschließend sollen zwei repräsentative Fälle geschildert werden, um nochmals die Möglichkeit von laborchemischen Fehldiagnosen durch Rheumafaktoren zu unterstreichen.

Im ersten Fall handelt es sich um einen 45-jährigen Patienten, bei dem anamnestisch ein Alkoholabusus mit konsekutivem Leberzellschaden und eine Adipositas bekannt waren.

Durch den positiven Reaktionsausfall des TPHA- und des FTA-Abs.-Testes wurde eine Syphilis nachgewiesen.

Um Aufschluß über die Aktivität der serologisch gesicherten Treponemeninfektion zu erhalten, wurde das Patientenserum zusätzlich mit dem VDRL-Test und dem IgM-FTA-Abs.-Test geprüft: der VDRL-Titer betrug 1:8, der Fluoreszenztest zeigte ein reaktives Ergebnis (Titer 1:20).

Sowohl mit dem Latex-Objektträger-Test, als auch mit dem RAHA-Test konnten in dem Serum Rheumafaktoren nachgewiesen werden (Titer: Latex-Objektträger-Test 1:64, RAHA-Test 1:2560).

Nach Absorption der Rheumafaktoren mit Latex-Absorbent, war das zuvor reaktive Testergebnis im IgM-FTA-Abs.-Test nicht mehr reproduzierbar.

Der zweite Patient war 40 Jahre alt und hatte ebenfalls einen Leberzellschaden.

Alle serologischen Tests zeigten auch in diesem Fall reaktive Ergebnisse.

Die Konzentration der Rheumafaktoren im Serum war noch höher als bei dem anderen Patienten: Latex-Objektträger-Test 1:1040, RAHA-Test 1:5120.

Nach Gelfiltration des Serums war der 19S-IgM-FTA-Abs.-Test nicht reaktiv.

Die Serumabsorption mit Latex-Absorbent führte zu einer deutlichen, jedoch nicht vollkommenen Reduktion der Fluoreszenzstärke im IgM-FTA-Abs.-Test, so daß der Test als schwach reaktiv beurteilt wurde.

Die verbliebene Restfluoreszenz ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß nicht die gesamte Menge der Rheumafaktoren - deren Konzentration in diesem Fall sehr hoch war - aus dem Serum eliminiert wurde.

In beiden Fällen konnte bei serologisch gesicherter Syphilis mit dem VDRL-Test keine eindeutige Aussage über die Notwendigkeit einer antisyphilitischen Therapie gemacht werden, da dieser Test bekanntermaßen bei Leberzellschaden falsch reagieren kann.

Auf Grund des reaktiven Ergebnisses des IgM-FTA-Abs.-Tests, war zunächst eine aktive und somit behandlungsbedürftige Treponemeninfektion anzunehmen. Da gleichzeitig bei beiden Patienten Rheumafaktoren nachgewiesen wurden, konnte eine endgültige Bewertung des IgM-Befundes erst nach Absorption der Rheumafaktoren mit Latex-Absorbent bzw. nach Gelfiltration erfolgen. Nach Entfernung der das Testsystem störenden Rheumafaktoren, zeigte der IgM-Fluoreszenztest keine reaktiven Ergebnisse mehr. Somit war bei beiden Patienten keine Behandlungsindikation gegeben.

4. Schlußfolgerungen

Die in der Literatur gefundenen Hinweise auf eine potentielle Beeinflussung der Ergebnisse des IgM-FTA-Abs.-Testes durch Rheumafaktoren konnten sowohl in dem unter 3.2.2. geschilderten Modellversuch, als auch durch die Untersuchung einer Reihe von Seren von Patienten mit Syphilis verschiedener Stadien bestätigt werden.

Es hat sich gezeigt, daß im IgM-FTA-Abs.-Test unspezifische Fluoreszenzeffekte auftreten können, wenn der Rheumafaktorgehalt im Serum zwar niedrig, die Konzentration der Treponema pallidum-spezifischen IgG-Antikörper jedoch hoch ist.

Hohe IgG-Antikörper werden in Fällen von latenter bzw. spätlatenter Syphilis gefunden. Da mit zunehmender Dauer der Erkrankung auch vermehrt Rheumafaktoren gebildet werden können, besteht gerade bei diesen Patienten die Gefahr, daß zwischen einer Lues satis curata und einer behandlungsbedürftigen, aktiven Erkrankung mittels der IgM-Diagnostik nicht differenziert werden kann.

Andererseits kann eine unspezifische IgM-Fluoreszenz auch bei niedrigem IgG-Antikörpertiter und gleichzeitig hohem Rheumafaktorgehalt des Serums auftreten.

Auf solche Antikörperkonstellationen trifft man bei Patienten mit frühzeitig behandelter Syphilis (Stadium I) und hoher Rheumafaktorkonzentration im Serum, welche ursächlich nicht durch die Treponeminfektion bedingt ist.

Da in 17,5 % der Seren von Syphilitikern Rheumafaktoren gefunden wurden, besteht bei fast jedem fünften Serum, das mit dem IgM-FTA-Abs.-Test untersucht wird, die Möglichkeit eines unspezifischen Reaktionsausfalls des Testes.

Aus diesem Grund ist zu fordern, daß jeder reaktive oder schwach reaktive IgM-Befund mit einem möglichst empfindlichen Rheumafaktor-Test (z.B. RAHA-Test, RIA, Lasernephelometer) auf seine Spezifität hin überprüft wird. Der Latex-Objektträger-Agglutinationstest ist zum Nachweis von Rheumafaktoren für die Syphilis-Serologie nicht geeignet, da er nicht empfindlich genug reagiert.

Werden im Serum Rheumafaktoren nachgewiesen, so ist eine Serumabsorption mit aggregiertem IgG durchzuführen. Es hat sich bewährt, das aggregierte IgG an suspendierte Polystyrol-Partikel (Latex) anzulagern, um die Rheumafaktoren mit dem unter 2.3 beschriebenen "Latex-Absorbent", aus dem Serum zu entfernen.

Nimmt die Fluoreszenzstärke im IgM-FTA-Abs.-Test nach diesem Absorptionsschritt ab, so kann davon ausgegangen werden, daß Rheumafaktor-bedingte unspezifische Fluoreszenzeffekte eliminiert worden sind.

Mit einer Absorption von Treponema pallidum-spezifischen IgM-Antikörpern an das Latex-Absorbent und einer dadurch bedingten Fluoreszenzreduktion ist nicht zu rechnen.

Bei einigen Seren, in denen mit dem RAHA-Test keine Rheumafaktoren nachgewiesen werden konnten, wurde festgestellt, daß nach der Serumabsorption mit Latex-Absorbent die Fluoreszenzstärke ebenfalls abnahm. In diesen Fällen ist anzunehmen, daß durch die Latex-Absorption eine unspezifische Fluoreszenz beseitigt wurde, deren Ursache Rheumafaktoren waren, welche mit dem RAHA-Test nicht erfaßt werden konnten.

Für das "Versagen" des RAHA-Testes kommen zwei Möglichkeiten in Betracht:

a. die Empfindlichkeit des Testsystems ist nicht ausreichend, oder

b. es handelt sich um Rheumafaktoren, die nicht zur Reaktion mit Kaninchen-IgG befähigt sind, sondern nur mit humanem aggregierten IgG eine Verbindung eingehen.

5. Zusammenfassung

835 Seren wurden untersucht, die teils von Patienten mit verschiedenen Stadien der Syphilis, teils von Blutspendern mit negativer Syphilis-Serologie stammten.

Mit dem RAHA-Test konnte in 17,5 % der Seren von Patienten mit einer sicher durchgemachten Treponema pallidum-Infektion der Rheumafaktor nachgewiesen werden, während bei nicht an Syphilis erkrankten Individuen nur in 7,8 % der Fälle Rheumafaktoren gefunden wurden.

In mehreren Versuchen konnte gezeigt werden, daß Rheumafaktoren über eine immunologische Reaktion mit Treponema pallidum-spezifischen IgG-Antikörpern zu einer unspezifischen Fluoreszenz im IgM-FTA-Abs.-Test führen können.

Um diese Fehlerquelle zu eliminieren, wurde ein Verfahren zur Absorption der Rheumafaktoren aus dem Serum entwickelt: hierbei werden die das Testsystem störenden Rheumafaktoren durch an Polystyrol-Partikel fixiertes aggregiertes IgG ("Latex-Absorbent") aus dem Patientenserum entfernt.

Die Serumabsorption mit dem Latex-Absorbent führte in der Regel zu einer signifikanten Reduktion der unspezifischen Fluoreszenzeffekte.

Aus den gefundenen Ergebnissen ergibt sich die Forderung, jeden reaktiven oder schwach reaktiven IgM-Befund auf seine Spezifität hin zu überprüfen.

LITERATUR

(1) Atwood W.G., J.L. Miller:
Fluorescent treponemal antibodies in fractionated syphilitic sera. The immunoglobulin class,
Arch. Derm. 100 (1969), 763

(2) Avrameas S. and T. Ternynck:
The cross-linking of proteins with glutaraldehyde an its use for the preparation of immunoadsorbents.
Immunochemistry 6 (1968), 53

(3) Bach G.L., M. Eichhorn, J. Schmidt:
Rheumafaktoren im Alter
Z. Geront. 6 (1973), 3, 153

(4) Delhanty J.J. and R.R. Catteral:
Immunoglobulins in Syphilis
Lancet II (1969), 1099

(5) Dissanayake S., F.C. Hay and J.M. Roitt:
The binding constants of IgM rheumatoid factors an their univalent fragments for native an aggregated human IgG.
Immunology 32 (1977), 309

(6) Fraser K.B., P.V. Shirodaria and C.F. Stanford:
Fluorescent staining and human IgM.
Brit. med. J. 3 (1971), 707

(7) Gschwandtner W.R. und J. Zelger:
Maskierte Syphilis
Z. Hautkr. 51 (1976), 735

(8) Heide K. and H.G. Schwick:
Salt fractionation of immunoglobulins.
Handbook of Experimental Immunology Volume I
Blackwell Scientific Publications 3. Aufl. (1978), 61

(9) Horejsi J. and R. Smetana:
The isolation of gamma globulin from blood-serum by rivanol.
Acta Medica Scandinavica 155 (1956), 65

(10) Hunter E.F., W.E. Deacon and P.E. Meyer:
An improved FTA test for syphilis: the absorption procedure (FTA-Abs.).
Publ. Hlth. Dep. 79 (1964), 410

(11) Hunter E.F., S.E. Maddison, S.A. Larsen, M.B. Felker, J.C. Feeley:
Immunoglobulin specifity for the fluorescent treponemal antibody-absorption test conjugate.
J. clin. Microbiol. 4 (1976), 338

(12) Kunkel H.H., E.C. Franklin and H.J. Müller-Eberhard:
Studies on the isolation and characterisation of the "rheumatoid factor".
J. clin. Invest. 38 (1959), 424

(13) Kunkel H.G., H.J. Müller-Eberhard, H. Fudenberg and T.B. Tomasi:
Gamma-globulin complexes in rheumatoid arthritis and certain other conditions.
J. clin. Invest. 40 (1961), 117

(14) Lassus A.:
Development of rheumatoid factor activity and cryoglobulins in primary and secondary syphilis.
Int. Arch. Allergy 36 (1969), 515

(15) Müller F., P.L. Loa:
Neue Möglichkeiten in der immunologischen Diagnostik der Treponemen-Infektion.
Infection 2 (1974), 127

(16) Müller F.:
Perspektiven immunologischer Syphilis-Diagnostik.
Dtsch. Ärztebl. 73 (1976), 9

(17) Müller F.:
Zur Technik des Nachweises treponemenspezifischer 19S-IgM-Antikörper bei der latenten und spätlatenten Syphilis.
Immunität und Infektion 5 (1977), 109

(18) Mustakallio K.K., A. Lassus an O. Wager:
Auto-immune phenomena in syphilitic infection: rheumatoid factor and cryoglobulins in different stages of syphilis.
Int. Arch. Allergy 31 (1967), 417

(19) Normansell D.E.:
Anti-γ-globulin in rheumatoid arthritis sera-II.
The reactivity of anti-γ-globulin rheumatoid factors with altered γG-globulin.
Immunochemistry 8 (1971), 593

(20) Normansell D.E.:
Anti-γ-globulin in rheumatoid arthritis sera-III.
The reactivity of anti-γ-globulin rheumatoid factors with heterologus γG-globulin.
Immunochemistry 9 (1972), 725

(21) Peltier A. and C.L. Christian:
The presence of the "rheumatoid factor" in sera from patients with syphilis.
Arthr. Rheum. 2 (1959), 1

(22) Rathlev T.:
Haemagglutination utilizing pathogenetic treponema pallidum for serodiagnosis of syphilis.
Brit. J. vener. Dis. 43 (1967), 181

(23) Reimer C.B., C.M. Black, D.J. Phillips, L.C. Logan, E.F. Hunter, B.J. Pender and B.E. McGrew:
The specifity of fetal IgM: antibody or anti-antibody?
Ann. N.Y. Acad. Science 254 (1975), 77

(24) Rheins M.S., Ph.D.W. McCoy, R.G. Burell, M.Sc., and E.V. Buehler, M.Sc.:
A modification of the latex-fixation test for the study of rheumatoid arthritis.
J. Lab. Clin. Med. 50 (1957), 113

(25) Richterich R.:
Klinische Chemie, S. Karger 3. Aufl. (1971), 305

(26) Schmidt W.A.K. und M. Klein:
Ein Latex-Agglutinationstest zur Typenbestimmung von Enteroviren.
Arch. ges. Virusforschung 43 (1973), 213

(27) Shirodaria P.V., K.B. Fraser an F. Stanford:
Secondary fluorescent staining of virus antigens by rheumatoid factor and fluorescein-conjugated anti-IgM.
Ann. rheum. Dis. 32 (1973), 53

(28) Simons K., K. Aho, P. Seppälä, O. Wagner:
Purification of the rheumatoid factor.
Clin. Chim. Acta 9 (1964), 519

(29) Singer J.M. and C.M. Plotz:
The latex fixation test for rheumatoid arthritis using patients' own gamma globulin.
Arthr. Rheum. I (1958), 142

(30) Stastny M. and J. Horejsi:
The interaction of acridine dyes with blood plasma proteins.
Clin. Chim. Acta 6 (1961), 782

(31) Van Snick J.L., E. van Roost, B. Markowetz, C.L. Cambiaso and P.L. Masson:
Enhancement by IgM rheumatoid factor of in vitro ingestion by macrophages and in vivo clearance of aggregated IgG or antigen-antibody complexes.
Eur. J. Immunol. 8 (1978), 297

(32) Vorleander K.O.:
Praxis der Immunologie
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1976), 311

(33) Wilkinson A.E. and P. Rodin:
IgM-FTA test in syphilis in adults
Its relation to clinical findings
Brit. J. vener. Dis. 52 (1976), 219

(34) Yeni P., P. Segond, P. Massias, J. Pillot:
False positive IgM anti-toxoplasma-fluorescent test due to rheumatoid factor.
Lancet I (1978), 219

L E B E N S L A U F

GABOR VLAZAK

geboren am	14.4.1954
in	Budapest
Eltern	Otto Vlazak, Chemiker und Marta Vlazak, geb. Varga
Schulausbildung	1960 bis 1964 Volksschule in Budapest 1965 bis 1973 Gymnasialzeit - Abschluß: Abitur
Studium	1973 bis 1980 Medizinstudium an der Universität Düsseldorf
Sonstige Daten	1964 Emigration in die Bundesrepublik Deutschland 1979 Einbürgerung Seit Dezember 1980 tätig als Assistenzarzt bei Herrn Prof.Dr. G. Blümchen in der Klinik Roderbirken